

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Marburg

SPURENKUNDLICHE IDENTIFIZIERUNG VON
FETAL- UND NEUGEBORENIENBLUT MITTELS
ALPHA₁-FETOPROTEIN-PRÄZIPITATION IN DER
CELLULOSE-ACETAT-FOLIEN-(CAF)-ELEKTROPHORESE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MIRTSCHO STAFUNSKY
aus Marburg/Lahn

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Marburg

SPURENKUNDLICHE IDENTIFIZIERUNG VON
FETAL- UND NEUGEBORENIENBLUT MITTELS
ALPHA₁-FETOPROTEIN-PRÄZIPITATION IN DER
CELLULOSE-ACETAT-FOLIEN-(CAF)-ELEKTROPHORESE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MIRTSCHO STAFUNSKY

aus Marburg/Lahn

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 17. Dezember 1976

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. I. Oepen

Correferent: Prof. Dr. F. Schleyer

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsangabe

A. Einleitung

Bisher vorliegende Ergebnisse

I. Untersuchungen von Erythrocyten - sowie Serummerkmale in der Spurenkunde zur Unterscheidung von Neugeborenen - und Erwachsenenblut	2
II. Das α_1 -Fetoprotein	
1. Die Entdeckung des α_1 -Feto- proteins	4
2. Das α_1 -Fetoprotein im Serum	4
3. Physikalisch-chemische Eigen- schaften	5
III. Die Untersuchung von PATZELT, GESERICK und LIGNITZ	7
IV. Fragestellung	9

B. Eigene Untersuchungen

I. Untersuchungs-Material, Anlegen der Blutspuren, anschließende Lagerung und Aufbereitung	
1. Untersuchungsmaterial	10
2. Anlegen der Blutspuren	11
3. Lagerung der Blutspuren	11
4. Aufbereitung der Spuren	12

II. Arbeitsmaterial, Untersuchungsmethode, Vorversuche, Variation der Versuchsbedingungen, Reagenzien und optimale Methodik	
1. Arbeitsmaterialien	14
2. Untersuchungsmethode	18
3. Vorversuche	24
4. Variation der Versuchsbedingungen	27
5. Reagenzien, Geräte, Materialien	30
6. Optimale Methode	31
III. Untersuchung der künstlich angelegten und gealterten Blutspuren und Befunde	
1. Untersuchung der Blutspuren	36
2. Befunde	36
C. <u>Besprechung</u>	37
D. <u>Zusammenfassung</u>	41
E. <u>Literatur</u>	43

A. Einleitung

Bisher vorliegende Ergebnisse

Im Falle eines Verdachtes auf Kindestötung oder illegalen Abort kann die Unterscheidung von Fetal- oder Neugeborenenblut und Erwachsenenblut an Blutspuren von Bedeutung sein. Von den Justizbehörden können dann Blutspuren an Windeln, Kleidung, Betten und anderen Einrichtungsgegenständen aus verschiedenen Materialien zur Untersuchung gegeben werden. Die immer wiederkehrenden Spurenträger sind vorwiegend aus Holz, Glas, Papier und Stoff.

Zur Zeit existieren mehrere Methoden zur Unterscheidung von Fetal- bzw. Neugeborenenblut und Erwachsenenblut:

I. Untersuchungen von Erythrozyten - sowie
Serummerkmalen in der Spurenkunde zur Unter-
scheidung von Neugeborenen- und Erwachsenen-
blut

Für diese Untersuchungen erwies sich vor allem ein Merkmal der Erythrozyten als geeignet: das fetale Hämoglobin (HbF) des Fetal- und Neugeborenenblutes, das wegen seiner Alkaliresistenz, sowie seiner unterschiedlichen elektrophoretischen und chromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber Erwachsenenhämoglobin (HbA) diagnostiziert werden kann. Ebenso werden spezifisch präzipitierende Anti-HbF-Seren erfolgreich in der Spurenkunde verwendet (Übersicht bei SCHLEYER).

Aber auch Merkmale des Neugeborenen-serums lassen sich für die Spurenkunde verwerten. Weniger geeignet sind zwar die von FORSTER und JOACHIM beschriebenen Besonderheiten im Gc-System oder die von PROKOP beobachtete für Neugeborene und Kleinkinder spezifische Ausbildung des alpha-Makroglobulinpräzipitats in der Immunelektrophorese, da sie wegen ihrer geringen immunelektrophoretischen Positionsdifferenzen im Vergleich zu den Präzipitaten im Serum Erwachsener in der Spurenkunde kaum zu verwerten sind. Als ebenfalls unbefriedigend erwies sich die von GESERICK, MARTH

und HACKBARTH in Serumproben von 125 Neugeborenen mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese gefundene Doppelung der Albuminfraktion, die im Serum der Mütter stets fehlte. Dieses Merkmal trat nämlich artefiziell auch in Spuren von Erwachsenenblut auf, sodaß es nur zur Differenzierung nativer Blutproben verwendbar ist.

Ein weiteres Serummerkmal des Feten und des Neugeborenen ist das von BERGSTRAND und CZAR beschriebene α_1 -Fetoprotein (AFP), das in fetalen und neonatalen Blutproben stets nachweisbar ist, aber auch bei Erwachsenen mit bestimmten malignen Tumoren vorkommt.

II. Das α_1 -Fetoprotein

I. Die Entdeckung des α_1 -Fetoproteins

Im Jahre 1944 fand PEDERSEN ein Serumprotein (Fetuin) genannt, welches lediglich beim neugeborenen Kalb, nicht aber beim adulten Tier nachgewiesen werden konnte. 1956 entdeckten BERGSTRAND und CZAR ein "analoges" Protein beim Menschen, welches wegen seines bis dahin bekannten Vorkommens beim Fetus sowie seines Verhaltens im elektrischen Feld als α_1 -Fetoprotein (AFP) bezeichnet wurde.

2. AFP im Serum

VAN FURTH und ADOLFINI konnten später an Hand von Zellkulturen zeigen, daß AFP in Zellen der fetalen Leber und der Plazenta entsteht. Die Serumkonzentration des AFP nimmt beim Menschen bis zur 10. bis 16. Schwangerschaftswoche zu, erreicht dann mit 200 bis 300 mg/ml ein Maximum und nimmt danach rasch ab. Bei der Geburt findet man nur noch wenig im Nabelschnurblut. Im Neugeborenen Serum fällt sein Gehalt mit einer Halbwertszeit von ca. vier Tagen ab; es verschwindet 2 bis 3 Wochen post partum ganz. Bis zur Beendigung des ersten Lebensjahres kann bei akuter Virushepatitis, Gallengangsatresie, infektiöser

Mononukleose und hepatogen bedingter Hyperbilirubinämie anderer Genese in 30-68 % der Fälle ein Wiederauftreten von AFP im Serum beobachtet werden. Der Nachweis von AFP im Serum Erwachsener ist pathognomonisch für Hepatom und Teratom (ALPERT, ABELEEV, GASSNER, GROB, LEHMANN u. Mitarb., LINDER, SEPPÄLÄ).

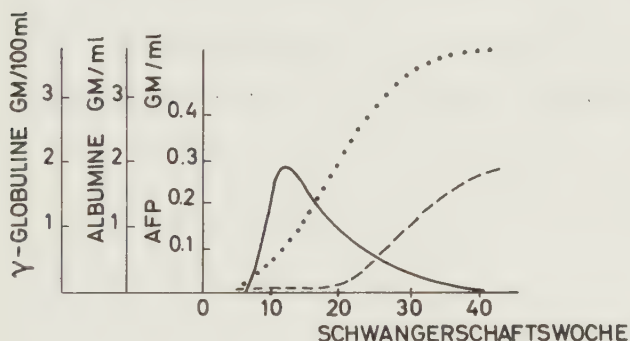


Abb. 1 Konzentration von AFP (—), Albumin (...) und -Globulinen (---) im fetalen Serum. Modifiziert nach GITLIN u. BOESMAN.

3. Physikalisch-chemische Eigenschaften des AFP

Bei dem AFP handelt es sich um ein saures Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt von 4,75 und einem Molekulargewicht von 70000. Es besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und enthält 4,3 % Kohlenhydrate, davon 0,9 % Neuraminsäure. LEHMANN u. Mitarb. ist es gelungen, AFP zu isolieren und zu kristallisieren.

Das in Zusammenhang mit Hepatomen gebildete AFP scheint gegenüber dem fetalen AFP gewisse Unterschiede aufzuweisen. Bei der Immunelektrophorese nach LAURELL (pH 5) konnten beim AFP des Hepatoms vier verschiedene "peaks" nachgewiesen werden, beim fetalen AFP war dagegen keine derartige Auftrennung feststellbar (LEHMANN u. Mitarb.)

Dank der Möglichkeit, Antikörper gegen AFP herzustellen, eignen sich verschiedene immunologische Methoden zu seiner Bestimmung.

III. Die Untersuchungen von PATZELT, GESERICK und LIGNITZ

Anlass der vorliegenden Arbeit war eine Veröffentlichung von PATZELT, GESERICK und LIGNITZ, in der die Verwertbarkeit des AFP in der Spurenkunde an Hand experimentell erzeugter und bei verschiedenen Bedingungen gelagerter Blutspuren untersucht wurde.

Die Verfasser führten den Nachweis einer AFP-positiven Spur in der Überwanderungselektrophorese mittels Heteroimmunserum.

Als Trägermedium wurde ein 1 % Agargel verwendet mit einem Veronal-Na/Na-Acetat/HCl Puffer (pH 8,1) nach PESENDORFER et al.

Das zu allen Testungen verwendete Antiserum wurde durch Kaninchenimmunisierung mit einem Nabelvenenserumpool und nachfolgender Absorption mit Erwachsenenserum erzeugt. Die Blutspuren bestanden aus durch Citratzusatz ungerinnbar gemachten Nabelvenen- und ebenso präparierten Erwachsenenbluten, die auf verschiedene Trägermaterialien, Holz, Glas, Stoff und Papier aufgebracht, angetrocknet und bis zu 12 Wochen bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Blutspuren, die zwei Jahre bei Zimmertemperatur gelagert waren, und auch solche,

die sich zwei Jahre im Kühlraum bei ca. 8⁰ C befanden, wurden ebenfalls untersucht.

In den künstlich erzeugten und bei Zimmertemperatur gelagerten Spuren von Neugeborenenblut konnte das AFP bisher bis zu einem Spurenalter von 12 Wochen nachgewiesen werden.

IV. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Einführung der Cellulose-Acetat-Folien-Technik am Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg, verbunden mit dem Versuch, mit Hilfe dieser Methode den spurenkundlichen Nachweis von Neugeborenen- oder Fetalblut durch AFP-Präzipitation zu führen.

Zugleich galt es, mit dieser Technik die zeitliche Nachweisgrenze des AFP bei gealterten Blutspuren auf verschiedenen Trägermaterialien zu ermitteln.

Dabei sollte ein Routineverfahren entwickelt werden, daß sicher, schnell und gut dokumentierbar ist.

B. Eigene Untersuchungen

I. Untersuchungsmaterial, Anlegen der Blut- spuren, anschließende Lagerung und Aufbereitung

1. Untersuchungsmaterial *)

Blutproben: Für die Untersuchungen wurde frisches Nabelvenenblut aus den gynäkologischen Abteilungen der Universitätsfrauenklinik Marburg, des Stadt- und Kreiskrankenhauses in Wetzlar, des Kaiserin-Auguste-Victoria-Krankenhauses in Ehringhausen sowie des Diakoniekrankenhauses, Wehrda/Marburg, verwendet.

Das zur Kontrolle dienende Erwachsenenblut stammte von Spendern der Blutbank des Klinikums in Marburg.

Für alle Testungen wurde das Antiserum gegen humanes AFP vom Kaninchen (BEHRING-WERKE, Kontroll-Nr. 2260) verwendet.

*) Den Abteilungsleitern der oben genannten Kliniken sowie dem Leiter der Marburger Blutbank und vor allem deren Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der Blutproben.

Herrn Dr. Münscher, Behringwerke Marburg, danke ich für die freundliche Überlassung von Probenpackungen.

2. Anlegen der Blutspuren

Durch Citratzusatz ungerinnbar gemachtes frisches Nabelvenen- und genauso präpariertes Erwachsenenkontrollblut wurde auf verschiedene Trägermaterialien getropft. Diese waren ungefähr gleich große, zuvor zurechtgeschnittene Spurenträger, nämlich Furnierholz, Fensterglas, weißer Leinenstoff sowie Filterpapier (Nr. 2043 b Schleicher u. Schüll). Auf einen 5 cm x 2,5 cm großen Spurenträger konnte nun gut etwa 1 ml des Nabelvenen- oder Erwachsenenblutes aufgetragen werden. Am zweckmäßigsten erwies es sich, die so angelegten Spuren über Nacht bei Zimmertemperatur zum Trocknen liegen zu lassen. Es stellte sich heraus, daß die Spuren auf Papier und Stoff am schnellsten trockneten und die größte Spurenfläche bildeten.

3. Lagerung der Blutspuren

Das erfreulicherweise große Angebot an Blutproben sowie deren Datierung gestattete eine Erfassung der Blutspuren in kontinuierlicher Folge.

Hierdurch war es möglich, einen Plan aufzustellen, aus dem sich jeder Zeit das genaue Alter einer Spur ablesen ließ und der somit ein lückenloses und fehlerfreies Aufarbeiten der künstlich

angelegten Blutspuren garantierte. Die so präparierten Proben wurden nach dem Alter geordnet, nummeriert und in vorbereitete Schubladen zur Alterung bei Zimmertemperatur gelegt.

Die auf Glas angelegten Spuren mußten besonders behutsam behandelt werden, da sich der Blutstaub leicht löste. Zur Verhinderung von Spurenübertragungen wurde sauberes Papier zwischen die einzelnen Leinenläppchen sowie Holz und Papier gelegt.

So konnte eine große Zahl von Spuren dank der gewählten Spureenträger sowie deren Größe auf kleinem Raum gelagert werden. Die Temperaturschwankungen während der Lagerung bewegten sich entsprechend der Jahreszeit zwischen 20 und 30° C.

4. Aufbereitung der Blutspuren

Die Spurenaufbereitung von den Trägermaterialien Holz und Glas machte keine Schwierigkeiten. Jeweils die ganze angetrocknete Blutspur wurde sorgfältig von dem entsprechenden Trägermaterial gelöst. Von der Glas- und Holzfläche wurde das angetrocknete Blut mit einem Metallspatel abgekratzt und in 5 Tropfen = 0,25 ml Aqua dest. gelöst.

Das vom Blut durchtränkte Stoff- oder Filterpapierstück wurde ausgeschnitten und in kleine

Stückchen und Fasern zerkleinert. Anschließend wurde ebenfalls 0,25 ml Aqua dest. hinzugegeben.

Während die Blutfleckenlösung von Glas und Holz nur etwas geschüttelt und dann stehen gelassen wurde, mußten die Stoff- und Filterpapierstückchen intensiver und länger behandelt werden. Jedes Röhrchen wurde mehrfach in Abständen von 30 Minuten geschüttelt und die Inhalte wurden mit einem Glasstab aufgerührt. Nach etwa 6 Stunden wurden die Stoff- und Filterpapierstückchen noch einmal kräftig ausgepreßt und die Überstände abpipettiert. Die somit gewonnene Menge reichte für einen Tüpfel in der Überwanderungselektrophorese aus.

Bei diesem Vorgehen war die Spurenlösung 4 fach konzentrierter als das Frischblut, da die Ausgangsmenge pro Spur 1 ml Blut gewesen war.

II. Arbeitsmaterial, Untersuchungsmethode, Vorversuche und Variation der Versuchsbe- dingungen

1. Arbeitsmaterialien

1.1. Folien:

Die Cellulose-Acetat-Folie (CAF) ist ein Trägernmaterial mit optimalen Trenneigenschaften und vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten.

Diese Membranfolie ist ein mikroporöses Schaumsystem und besteht aus mittelhoch bis hoch acetylierter Cellulose mit folgenden Eigenschaften

Mittlerer Porendurchmesser	0,6 μ
Schichtdicke	120 μ
Porenvolumen	ca. 80 %
Brechungsindex n_D	1,47

Der schaumförmige Aufbau mit relativ gleichförmigen Poren erleichtert den Durchgang der großen Moleküle. Trennungen finden daher in kurzer Zeit statt (KOHN, GRÜNE).

Da in der folgenden Untersuchung nach einem Routineverfahren gesucht wurde, fiel die Wahl auf das Kleinformat, da dieses ein technisch einfaches zeitsparendes und zuverlässiges Arbeiten garantiert. Außerdem liegt der Kostenaufwand bei Anwendung der Kleinformate in einer Größenordnung, in der auch

die routinemäßige Anwendung der Methode tragbar ist.

Für die elektrophoretischen Trennungen wurden das CAF-Elektrophoresesystem sowie Cellulose-Acetat-Folien (15 x 7,5 cm) der Fa. BIOTEST verwendet.*) Da dieses Elektrophoresesystem speziell für qualitative Bestimmungen entwickelt wurde und daher schnell und einfach in der Handhabung ist, lag es nahe, seine Eignung für rechtsmedizinische Blutspurenuntersuchungen zu prüfen.

1.2. CAF-Elektrophorese-System:

Dieser Elektrophorese-Satz besteht aus einer platzsparenden, handlichen Kammer mit den Maßen 27,5 x 20⁹,5 cm, der gut verschließbar ist mit einem aus durchsichtigem Kunststoff gefertigten Deckel.

*) Für eine großzügige Starthilfe bin ich der Fa. BIOTEST GmbH, Frankfurt/M., zu großem Dank verpflichtet.

Frau Scholz vom BIOTEST-Laboratorium, Dreieichenhain, danke ich für ihre wertvolle Hilfe bei der Einarbeitung in die Technik.

Dazu gehört ein praktisches Auftragesystem, bestehend aus einer durchsichtigen Auftrageschablone (10 x 2 cm) sowie einem Auftragekamm aus Kunststoff mit acht Zacken, die an ihrem Ende schräg abgeschliffen sind. Mit diesem einfachen Trick der Oberflächenvergrößerung und Standardisierung zur Probeaufnahme und Übertragung ist es möglich, durch einfaches Wenden des Kammes, d.h. der Zacken, entweder eine Probemenge von $5\mu\text{l}$ oder von $2,5\mu\text{l}$ von der Auftrageschablone aufzunehmen.

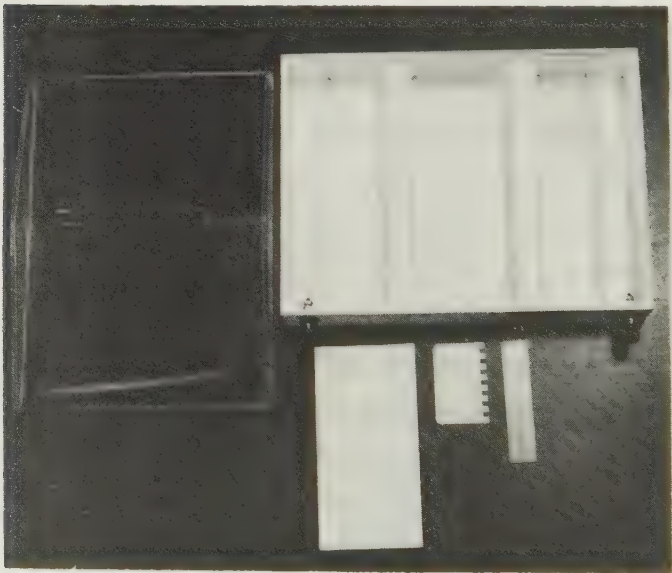


Abb. 2 CAF-Elektrophorese-System

1.3. Puffer:

Als Puffer wird der in der Gerätebeschreibung angegebene Veronalpuffer vom pH 9,2 verwendet (8,24 g Na-Veronal auf 1000 ml aufgefüllt und mit 1 n HCl auf pH 9,2 eingestellt.)

1.4. Stromversorgung:

Bei der CAF-Elektrophorese muß - ebenso wie bei Elektrophoreseverfahren mit anderen Trägern - ein Anschlußgerät an das Stromnetz verwendet werden, das mit einer Anordnung zur Konstanthaltung sowohl der Stromstärke als auch der Spannung versehen ist. Für die Routineelektrophorese ist die Konstanz der Stromstärke wichtiger als diejenige der Spannung. Sie beträgt 0,65 mAmp/cm Streifenbreite.

Für die Untersuchung wurde das Gerät DC 600 V der Fa. Vogel, Gießen, verwendet.

Unter diesen Versuchsbedingungen entsteht beim Zusammentreffen des gesuchten Proteinantigens mit dem spezifischen Antiserum, das durch Elektrodosmose zur Kathode bewegt wird, auf der Cellulose-Acetat-Folie eine sichtbare Präzipitationslinie.

2. Beschreibung der Untersuchungsmethode

Die in dieser Arbeit beschriebene Methodik deckt sich in vielen Punkten mit der für den Nachweis von AU/SH - Antigen und Antikörper beschriebenen Arbeitsweise von SONNEBORN und STINDL.

2.1. Vorbereitung der Elektrophoresekammer:

Beide Kammerräume werden mit je 250 ml Pufferlösung gefüllt. Dabei entsteht ein Flüssigkeitsspiegel gleicher Höhe in den durch Scheidewände abgeteilten Kammerräumen. Die oberen Kanten der Auflageflächen für die CAF-Streifen sind dann mit Hilfe von Filterpapier von der Pufferlösung zu trocknen.

2.2. Beschriftung der Elektrophoresestreifen:

Sie muß mit Hilfe einer säure- und alkali-resistenten Tinte (Kugelschreiber), welche sich im Puffer nicht löst, vorgenommen werden.

2.3. Tränkung der CAF-Streifen:

Grundsätzlich sollten die Membranfolien während des Arbeitsvorganges nie mit den Fingern berührt werden, da die CAF gegenüber mechanischer Beanspruchung sehr empfindlich ist. In trockenem Zustand bricht sie leicht, im feuchten Zustand

läßt sie sich dehnen. Bei Trocknungsprozessen neigt sie zu Kräuselungen und Verwerfungen.

Man läßt die Folien mit Hilfe zweier Deckglaspinzetten flach auf die Oberfläche der Pufferlösung fallen, sodaß sie schwimmen und durch kapillaren Sog von unten benetzt werden. Dieser Vorgang dauert nur einige Sekunden, erfordert aber einige Sorgfalt. Zu schnelles Eintauchen führt zu Lufteinschlüssen im Trägermedium, die nur sehr langsam entweichen und die gleichmäßige Tränkung stark behindern. Um eine absolute Tränkung zu erreichen, läßt man die Folie ca. 15 Minuten eintauchen.

Darauf nimmt man den puffer-feuchten Streifen heraus und preßt ihn leicht zwischen zwei Bogen Filterpapier, zuerst auf der einen und dann nach Umwenden auf der anderen Seite, bis keinerlei überflüssige Feuchtigkeit mehr vorhanden ist. Zu starkes Trocknen muß sorgfältig vermieden werden. Weiße Stellen auf dem matten Folienuntergrund deuten zu starke Trocknung an, der Streifen muß dann noch einmal getränkt werden, was man jedoch durch vorsichtiges Arbeiten vermeiden sollte, da eine zweite Tränkung nicht immer gleichmäßig gelingt. Es ist deshalb darauf zu achten, daß eine optimale Feuchtigkeit erreicht wird, die nur durch Erfahrung richtig eingeschätzt werden kann.

2.4. Einlegen der Membranfolie in die Elektrophoresekammer:

Die für die Routineelektrophorese besonders zu empfehlenden kleinen Streifen lassen sich sehr einfach handhaben. Zum Anfassen eignet sich wiederum die Deckglaspinzette. Man muß darauf achten, daß die Folien glatt und ohne Luftblasen auf der Auflage haften. Desgleichen ist ein Durchhängen der Folien zu vermeiden, denn Proben und Antiserum können so leicht verlaufen. Die Kammer ist dann sofort zu verschließen, um eine unregelmäßige Verdunstung von Pufferlösung auf dem CAF-Streifen zu vermeiden.

2.5. Auftragen der Serumproben:

Die vorbereiteten Serum- oder Spurenproben werden in Form von kleinen, gleichmäßigen Tröpfchen mittels der Eppendorf-Pipette ($20\ \mu\text{l}$) auf die Auftrageschablone aufgebracht und mit Hilfe des Auftragekammes auf die CAF-Streifen übertragen. Dabei sollte ein zu starker Druck vermieden werden, damit die Folie nicht durchhängt. Die Auftragestelle soll nahe der Mitte zur Kathodenseite der Folien hin liegen. Das Antiserum wird mit einer 0,05 %igen Bromphenolblaulösung versetzt ($10\ \mu\text{l}$ pro ml), um die Auftragestelle der Proben auf die Folien sichtbar zu

machen. Dann wird das Antiserum auf einer weiteren Schablone mit einer Eppendorf-Pipette ($20 \mu\text{l}$) in Form von Tropfen aufgebracht und ca. 1 cm von der Auftragestelle der Serumproben anodenwärts mit dem Auftragekamm aufgetragen.

E.-PHORESE	HOLZ	●	0	AS
NR. 40 AM 6.7.75	PAPIER	●	0	
	STOFF	●	0	
	GLAS	●	0	
	HOLZ	●	0	
	PAPIER	●	0	
	STOFF	●	0	
-	KONTROLLBLUT ERW.	●	0	
				+

○ Antiserum
● Blutproben

Abb. 3 Modell einer beschickten Folie

2.6. Elektrophoretische Trennung:

Die Routineelektrophorese auf CAF-Streifen führt man bei Zimmertemperatur aus.

pH der Pufferlösung: 9,2

Trennzeit: 25 Min.

Gleichspannung: 200 Volt

Stromstärke: 10 mA

2.7. Entfernung der nicht präzipitierten Eiweiße:

Nach beendeter Elektrophorese wird alles überschüssige Eiweiß von den CAF-Streifen entfernt. Bewährt haben sich Spülungen bis zu einer Stunde in physiologischer Kochsalzlösung.

2.8. Färben und Entfärben der Acetat-Streifen:

Generell läßt sich sagen, daß sich die für Filtrierpapier üblichen Anfärbemethoden auch bei der CAF anwenden lassen, vorausgesetzt, es werden keine Lösungsmittel verwendet, welche die Folie quellen lassen oder auflösen wie z.B. Aceton oder Chloroform.

Die Konzentration der Farbstofflösungen kann bei Verwendung der Acetatfolien schwächer sein als bei Papier; 0,2 %ige Lösungen genügen im allgemeinen.

Sehr wichtig ist es, darauf zu achten, daß die verwendeten Farbstoffe einheitlich, d.h. frei von Verunreinigungen sind, da letztere auch in kleinen Mengen die Untergrundfärbung ganz erheblich beeinträchtigen können.

Wie beim Tränken der Elektrophoresestreifen mit der Pufferlösung soll man auch bei der Anfärbung den Streifen möglichst flach auf die

Oberfläche des Farbbades auflegen, sodaß die Folie von unten her durchtränkt wird. Anschließend taucht man sie dann in das Farbbad ein. Bei ungleichmäßiger Benetzung können vor allem bei gewölbten Folien störende Farbinseln entstehen.

Als Anfärbungszeit genügt in den meisten Fällen eine Dauer von 10 Min., jedoch können die Streifen auch länger im Farbbad verbleiben.

Wenn durch unvorsichtige Vorbehandlung weiße Stellen oder Flecken entstanden sind, kann die Folie u.U. nicht verwendet werden.

2.9. Entfärbung der gefärbten Elektrophoresestreifen:

Cellulose-Acetat-Folien entfärben sich wesentlich schneller als Filtrierpapier. Es ist notwendig, das Entfärbebad 2 - 3 mal zu wechseln; das letzte Bad sollte fast farblos sein. Es ist nicht ratsam, das Entfärbebad zu lange auszu dehnen (nicht länger als 10 Min. pro Bad), da dann mit einem Herauslösen des an Eiweiß adsorbier ten Farbstoffes zu rechnen ist. Die zum Entfärben notwendige Zeit kann im übrigen durch Schütteln verkürzt werden.

Ist die Entfärbung abgeschlossen, nimmt man die Streifen aus dem Bad heraus, legt sie zwischen zwei Filterpapierbögen und streicht mit dem Handrücken vorsichtig die überschüssige Flüssigkeit

heraus. Zum genauen Ablesen zieht man dann die Membranfolie auf einer Glasplatte luftblasenfrei auf. Dieses wird am besten und einfachsten durch Abrollen mit einem Reagenzglas erreicht. Hält man dann die Glasplatte über eine Lichtquelle (schon eine normale Schreibtischlampe mit einer 60-Watt-Birne genügt), so kann man mühelos das Ergebnis der Elektrophorese ablesen. Die Folien lassen sich von der Glasscheibe durch Einlegen in destilliertes Wasser schon nach kurzer Zeit wieder lösen. Bis zur völligen Trocknung kann man die CAF-Streifen zwischen zwei Filterpapiere legen und anschließend zwischen zwei schweren Glasplatten pressen, bis sie vollkommen trocken sind.

3. Vorversuche

Die Vorversuche wurden zunächst mit citratversetztem Frischblut von Neugeborenen sowie Erwachsenen vom gleichen Tage gemacht, um die Frage nach einer Durchführbarkeit der Untersuchungsmethode zu beantworten.

Für die elektrophoretische Überwanderung wurde das CAF-Elektrophoresesystem und die Cellulose-Acetat-Folie wie in B.III.1 beschrieben, verwendet. Zu gleicher Zeit konnten zwei Folien mit je acht Proben analysiert werden. Jeweils gleiche Mengen Blut und Antiserum wurden mit Hilfe des

Auftragekammes in der Mitte der Folien in einem Abstand von 1 cm aufgetragen. Der Arbeitsablauf war wie in B.II.2. beschrieben. Anfängliche Mißerfolge waren auf mangelnde Arbeitstechnik zurückzuführen, doch prinzipiell zeigten die ersten Probeläufe brauchbare Ergebnisse. Nach häufigem Gebrauch der gleichen Pufferlösung zeigte sich eine zunehmende Unschärfe der Präzipitationslinien, sodaß nach dieser Feststellung der Puffer jeweils nach fünf Elektrophoresen erneuert wurde. Mit zunehmender Erfahrung wurden die Präzipitate deutlicher, sodaß die Frage nach der Durchführbarkeit grundsätzlich mit ja beantwortet werden konnte.

Nun galt es, die Anwendbarkeit des Systems anhand von künstlich erzeugten Blutspuren zu überprüfen. Die wie in B.1. 1-4 präparierten Blutspuren auf den vier Trägermaterialien sowie das Antiserum wurden mit Hilfe des Auftragekammes auf die Folien übertragen. Die Blutspuren waren 4 : 1 mit Aqua dest. verdünnt. Es wurden jeweils 0,5 μ l Blutlösung und Antiserum aufgetragen. Zur Kontrolle wurde in jedem Lauf eine Blutspur von Erwachsenenblut mitgeführt. Der methodische Ablauf entsprach der in B.II.2. geschilderten Weise, wobei die einzelnen Arbeitsabläufe variabel gestaltet wurden.

In der oben beschriebenen Weise konnten künstlich erzeugte Blutspuren von Neugeborenen zunächst bis zu 34 Tagen Lagerungszeit nachgewiesen werden. Damit deckten sich die eigenen mit den von PATZELT u. Mitarb. beschriebenen Ergebnissen.

4. Variation der Versuchsbedingungen

Nachdem die Vorversuche gelungen waren, wurde überlegt, ob die Methode verbessert werden könnte, um Kosten oder Arbeitszeit zu sparen.

Die in der Arbeitsanleitung für das Elektrophoresesystem von der Fa. BIOTEST angegebenen Werte für die Stromversorgung entsprachen den von KOHN, SONNEBORN und STINDL mitgeteilten Versuchsbedingungen. Eine Erhöhung der Stromspannung, die die Auftrennung beschleunigen könnte, führte zur Überhitzung der Folien sowie zum Abtropfen von Kondenswasser auf die Proben, die dadurch verliefen. Die Stromwerte konnten demnach nicht ohne Nachteil verändert werden. Die Überlegung zur Verdünnung oder Konzentrierung des Puffers mußte verworfen werden, da im Fall einer Verdünnung lediglich eine schnellere Wanderung resultierte, aber gleichzeitig auch eine Verbreiterung der einzelnen Proteinbanden. Keine Veränderung zeigten die Versuchsergebnisse, wenn die Folien, wie von KOHN angegeben, in einer erhöhten Pufferkonzentration (pH 9,5) getränkt wurden.

Verfährt man wie unter B.II.2.3. so sind die Folien schon nach 10 Min. gebrauchsfertig.

Das Auftragen mittels der Eppendorf-Pipette (20 μ l) auf die Schablonen und das Übertragen

der Blutproben und des Antiserums mit der Breitseite des Auftragekammes (entspr. 5 μ l je Kammzacke) auf die Folie stellt eine zügige und zugleich saubere Arbeitsmethode dar.

Aus Kostenersparnis wurde eine geringere Auftragemenge von Antiserum ausprobiert: 0,25 μ l. Die Präzipitate waren dann jedoch verwaschen oder fehlten, sodaß diese Überlegung wieder verlassen wurde.

Die Entfernung des nicht präzipitierten Eiweißes durch Einlegen der Folien in physiologische Kochsalzlösung sollte nach SONNEBOERN und STINDL eine Stunde dauern, doch haben Spülungen unter ständigem Badwechsel bis zu 30 Minuten die gleichen Ergebnisse gezeigt.

Zum Anfärben der Präzipitate wurden die vier folgenden Proteinfärbungen angewendet:

- Amidoschwarz: 1 %ige Lösung in 7 %iger Essigsäure, entfärben in Methanoleisessig 7 %ig.
- Azocarmin: 0,5 %ig in Methanol-Eisessig (9+1), Auswaschen in Methanol-Eisessig (9+1).
- Lichtgrün: 0,5 %ig in 5 %ig Trichloressigsäure, Auswaschen mit 5 %iger Trichloressigsäure.
- Ponceau S: 0,15 %ig Ponceau S Lösung in 3 % Trichloressigsäure, Entfärben in 5 %iger Essigsäure.

Amidoschwarz sowie Ponceau S erbrachten etwa gleich gute Färbeergebnisse, jedoch war bei Amidoschwarz die Färbezeit kürzer (5 Minuten) und die Entfärbezeit länger (10 Minuten), bei Ponceau S war die Färbezeit mit 10 Minuten gleich lang wie die Entfärbezeit. Beim wiederholten Anfeuchten der Folien zu Dokumentationszwecken waren die mit Amidoschwarz gefärbten Präzipitate deutlicher zu sehen als die mit Ponceau S, sodaß dem Amidoschwarz der Vorzug gegeben wurde. Der zum Ablesen der Folien gefundene einfache Weg, nämlich das Aufziehen auf einer Glasplatte und anschließendes Abrollen mit einem Reagenzglas zur Entfernung der Luftblasen verhinderte eine Beschädigung der gegenüber mechanischer Beanspruchung so empfindlichen CAF-Streifen.

Die in Anlehnung an SONNEBORN und STINDL modifizierte und erprobte Technik, mit der die Hauptversuche vorgenommen wurden, wird in B.II.6 als Arbeitsanleitung kurz zusammengefaßt.

5. Reagenzien, Geräte und Materialien:

Reagenzien: 5,5 Diäthylbarbitursaures

Natriumsalz MERCK 6318

1 n Salzsäure

0,05 %ige Bromphenolblaulösung

1 %iges Amidoschwarz

7 %ige Essigsäure

0,9 %ige Natriumchloridlösung

Aqua dest.

Geräte: CAF-Elektrophoresesystem BIOTEST:

Kammer 27,5 x 20,5 cm

Auftragesystem: Auftrageschablone

+ Auftragekamm

Eppendorf-Pipette 20 μ l

pH-Meter

zwei Deckglaspinzetten

Filterpapier

fünf Schalen

Glasplatten 10 x 20 cm

Gleichstromnetzgerät mit Ampèremeter

Proben und alpha-Fetoprotein enthaltende Blut-

Antiserum: proben,

alpha-Fetoprotein-Antiserum vom

Kaninchen, Kontroll-Nr. 2260 (BEHRINGWERKE),

versetzt mit 0,05 %iger Bromphenolblau-
lösung (10 μ l pro 1 ml)

Cellulose-Acetat-Folien (15 x 7,5 cm)

der Fa. BIOTEST

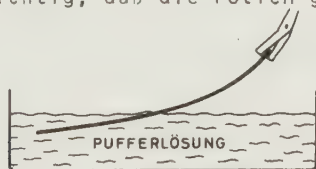
6. Optimale Methodik

1. Das Antiserum wird mit einer 0,05 %igen Bromphenolblaulösung versetzt ($10\mu\text{l}$ pro 1 ml), um die Auftragstelle der Proben auf die Folien sichtbar zu machen.

2. Der Puffer wird in die Elektrophoresekammer eingefüllt (je Kammerhälfte 250 ml): Veronalpuffer pH 9,2 (8,24 g Na-Veronal auf 1000 ml, mit 1 n HCl auf pH 9,2 eingestellt).

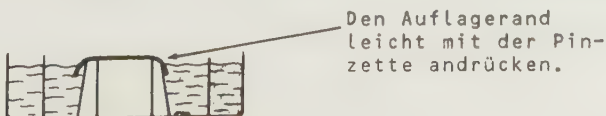
3. 200 ml Elektrophoresepuffer werden in eine Schale gefüllt und die Folien mit einer Pinzette für 10 Minuten hineingelegt.

Es ist wichtig, daß die Folien ganz eintauchen !



4. Die Folien werden dann mit einer Pinzette aus dem Puffer herausgenommen und zwischen zwei Filterpapieren von überschüssigem Puffer durch leichtes Darüberstreichen befreit.

5. Die Folien werden in die Elektrophoresekammer eingelegt, und dann die Kammer sofort mit dem Deckel verschlossen.



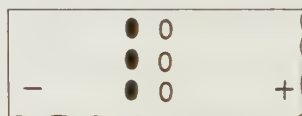
6. Die Untersuchungsproben werden mit der Eppendorf-Pipette ($20\ \mu\text{l}$) auf die Auftragschablone aufgetropft.



7. Das Antiserum wird auf einer zweiten Schablone ebenfalls mit der Eppendorf-Pipette ($20\ \mu\text{l}$) aufgetropft.

8. Der Kammerdeckel wird abgenommen und mit dem Auftragskamm zunächst die Untersuchungsproben und dann das Antiserum nahe der Mitte in einem Abstand von etwa 1 cm aufgetragen:

Antiserum ○ anodenwärts
Untersuchungs-
proben ● kathodenwärts



9. Die Kammer wird mit dem Deckel wieder verschlossen und der Strom eingeschaltet: 200 V. Bei Auftrennung auf zwei Folien zeigt das Isoelektrophoret ca. 10 m an. Dauer der Elektrophorese: 25 Minuten.

10. In drei Schälchen werden je 200 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung gegeben und die Folien nach dem Ende der Elektrophorese 30 Minuten unter ständigem Badwechsel zum Auswaschen nicht präzipitierter Eiweiße hineingelegt. Dabei müssen die Folien öfters bewegt werden.

11. Die Folien werden für fünf Minuten mit 1 %iger Lösung Amidoschwarz in 7 %iger Essigsäure gefärbt und müssen dabei möglichst flach auf die Oberfläche des Färbekades eingelegt werden.

12. Zum Entfärben liegen die Folien 20 Minuten in 7 %iger Essigsäure. Dabei ist das Färbekad vier bis fünfmal zu wechseln und die Folien sollen vorsichtig hin und her bewegt werden.

13. Zur Dokumentation werden die Folien zwischen Filterpapier getrocknet und auf eine Glasplatte gelegt. Luftblasen werden durch Abrollen mit dem Reagenzglas entfernt. Die Glasplatte wird dann mit der Folie zum Ablesen über eine Lichtquelle gehalten.

In noch feuchtem Zustand werden die Folien dann endgültig zwischen zwei Filterpapierbögen, die mit einer Glasplatte beschwert werden, getrocknet.

Zur wiederholten Dokumentation genügt ein einfaches Anfeuchten der Folie mit Aqua dest.

Anmerkung: In einer Elektrophorese können zwei Folien mit je acht Untersuchungsproben beschickt werden. Um die Qualität der Präzipitatbildung nicht zu beeinträchtigen, soll man die Pufferlösung nach fünf Elektrophoresen erneuern.

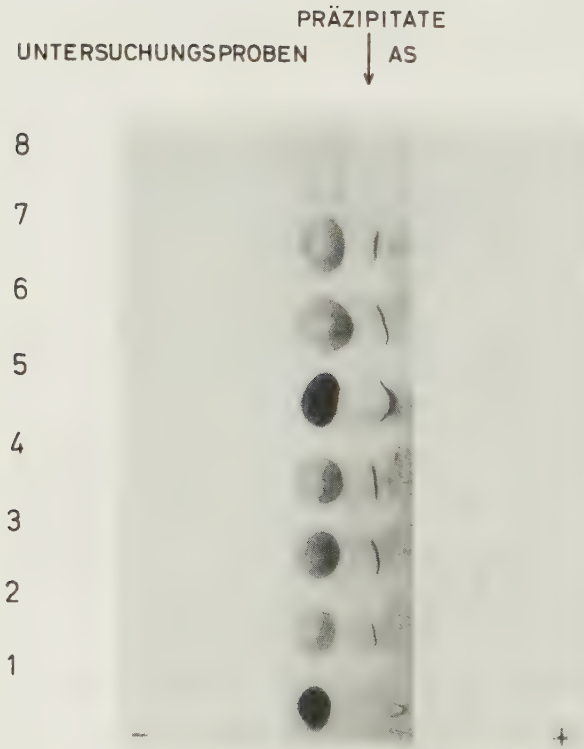


Abb. 4. Darstellung des AFP in der Überwanderungs-
elektrophorese auf OGE-Strifen.

Proben 1-7 künstlich erzeugte Blutspuren aus
Nabelvenenblut.

Probe 8 negative Kontrolle (Erwachsenenserum)
Antiserum (AS) Anti-AFP vom Kaninchen.

Beispiel für ein Protokollschema:

Elektrophorese Nr. 40 am 6.7.75

ROHR NR.	LAUF NR.	MAT.	DATUM	ALTER	ER- GEBNIS	BEMERKUNG
99	1	HOLZ	27.3.75	101	+	
100	2	PAP.	28.3.75	100	+	
101	3	STOFF	29.3.75	99	+	
102	4	GLAS	30.3.75	98	+	
103	5	HOLZ	31.3.75	97	+	
104	6	PAP.	1.4.75	96	+	
105	7	STOFF	2.4.75	95	+	
Kontr.- BLUT ERW.	8	GLAS	28.3.75	100	-	

Auswertung:

Nomenklatur

- + oder positiv: Es entsteht ein zu erkennen-
des und klares Präzipitat.
- (+) oder schwach pos.: Die Präzipitationslinie ist
sehr schwach ausgebildet,
gerade eben noch erkennbar.
- oder negativ: Keine Präzipitatbildung.

III. Untersuchung der künstlich angelegten und gealterten Blutspuren und Befunde

1. Untersuchung der Blutspuren

Die Herstellung und Aufbereitung der Blutspuren wurde entsprechend der Beschreibung unter B.I.1-4 vorgenommen. Das Anlegen und die Erfassung der Blutspuren in Form einer kontinuierlichen Folge gewährte eine genaue und rationelle Arbeitsweise, in der sich das entwickelte Verfahren als eine zuverlässige Methode erwies.

2. Befunde

Insgesamt wurden von 219 verschiedenen Nabel-venenbluten künstliche Spuren auf den vier Trägermaterialien Holz, Glas, Filterpapier und Leinen angelegt und diese 31 Wochen bei Zimmertemperatur gelagert.

342 Proben aus diesem Zeitabschnitt wurden systematisch aufgearbeitet und untersucht (siehe B.I. 1-4, B.II. 5-6). In allen Fällen zeigten die bei Zimmertemperatur gelagerten Blutspuren von Neugeborenen mit dem Antiserum eindeutige Präzipitate.

Bei den Spuren, die zur Kontrolle aus Erwachsenenblut (s.B.I. Fußnote) hergestellt worden waren und bei jeder Elektrophorese mitliefen, fehlte das Präzipitat stets.

C. Besprechung

Es kann davon ausgegangen werden, daß das AFP bei Neugeborenen immer nachweisbar ist, was von GESERICK und MÜLLER unter Verwendung der Überwanderungselektrophorese gezeigt werden konnte.

Im Serum gesunder Erwachsener ist das Protein, wie auch die vorliegende Untersuchungsmethode zeigt, nicht mehr nachweisbar. Allerdings können bei primären Leberzellcarzinomen und bei embryonalen Tumoren mit Dottersackstrukturen AFP bei Maus, Ratte und erwachsenen Menschen wieder synthetisiert werden. Bis jetzt werden drei verschiedene Fetoproteine beschrieben, die in der Zonenelektrophorese im α_1 -, α_2 -, und β -Globulin-Bereich wandern. Man bezeichnet sie deshalb als α_1 -, α_2 - und β -Fetoprotein (FOY, LAMERZ, LEHMANN).

Die eingeführte Untersuchungsmethode ist hochspezifisch (keine einzige Fehlbestimmung) und erbringt die gleichen Ergebnisse, die von PATZELT u. Mitarb. mit der Gargelelektrophorese gefunden wurden. Sie besitzt außerdem aber eine größere Empfindlichkeit als der Immundiffusionstest (ALPERT, MÜLLER, GESERICK), ohne jedoch so empfindlich zu sein, daß "falschpositive" Befunde z.B. bei pathologischen Schwangerschaften (Blutgruppeninkompatibilität, Gestose, fetomaternaler Transfusion, Diabetes mellitus), endodermalen

Sinustumoren, Teratoblastomen, Colon-Pankreas-, Gallenblasen - sowie Gallengangscarzinomen (ELGORT u. Mitarb., LEHMANN, U. LEHMANN, ZELTZ R) erhoben werden können. Die hier auftretenden AFP-Mengen können aber nur mit einer viel empfindlicheren Nachweismethode bestimmt werden.: dem Radioimmunoassay, der von NISHI und HIRAI entwickelt wurde. Bei dieser Technik wird das AFP mit Jod¹²⁵ markiert und anschließend nach der Doppelantikörpermethode bestimmt. Diese radioimmunologische Methode ist mit einer unteren Nachweisgrenze von 2 ng/ml gegenüber 10 µg/ml etwa 500 mal empfindlicher als die Immunpräzipitation in der GAF-Elektrophorese (HIRAI, LEHMANN, NISHI).

Für forensische Aufgaben ist eine solche Empfindlichkeit aber nicht notwendig, sondern die qualitative Bestimmung ausreichend.

Die Überwanderungselektrophorese und die Immundiffusion erfassen aber noch Mengen von AFP, die bei einigen benignen Erkrankungen auftreten können, wie Ataxia teleangiectasia (WALDMANN) hereditärer Tyrosinose (BUFFE) sowie selten und vorübergehend in wenigen Fällen bei akuter Virushepatitis (LEHMANN). Daher kommen solche Befunde als Fehlerquellen bei Blutspurenuntersuchungen in Betracht, in denen dann fälschlich Neugeborenenblut angenommen wird.

Die Möglichkeit eventueller unspezifischer Kreuzreaktionen mit Fetoproteinen anderer Species besteht theoretisch, wenn diese mit menschlichem AFP folgende Charakteristika gemeinsam haben:

1. die gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit zwischen den Albuminen und den α -Globulinen,
2. das ausschließliche Vorhandensein in der Fetalperiode,
3. die bereits erwähnte Kreuzreaktion der Antikörper, die auf gemeinsame antigene Eigenschaften hindeuten; so präzipitieren tatsächlich Antiseren gegen menschliches AFP auch Fetoproteine anderer Species z.B. Hund, Katze, Affe.

Diese Möglichkeit stellt aber kein Problem in der spurenkundlichen Untersuchung dar, da die Sicherung der Artspezifität "Mensch" am Anfang der spurenkundlichen Analyse zu stehen hat.

Abschließend ist die Anwendung der Cellulose-Acetat-Folien-Elektrophorese für die spurenkundliche Analyse unbedingt zu empfehlen, da diese Methode hochspezifisch ist und die Empfindlichkeit, wie die vorliegende Untersuchung zeigt, der Agargelelektrophorese entspricht. Die Vorteile gegenüber der bisher gebräuchlichen Agargelmethode sind nach KOHN, SONNEBORN und STINDL sowie eigenen Erfahrungen:

1. die kurze Zeitdauer der Elektrophorese (bei

routinemäßiger Anwendung z.B. für 16 Proben betrug die Gesamtdauer für Auftragen, Elektrophorese, Waschen, Färben bis einschl. Entfärben ca. 1 1/2 Stunden),

2. die Möglichkeit der einfachen und reproduzierbaren Dokumentation der Ergebnisse,

3. die einfachere Arbeitsweise (kein Herstellen von Agarplatten mehr, kein Ausstanzen der Brücken).

Der einzige Nachteil der CAF-Folien besteht darin, daß die Bildung der Präzipitationslinien während des Diffusionsvorganges nicht beobachtet werden kann, was jedoch unbedeutend ist.

Aufgrund der vorliegenden Studien und ihrer Diskussion kann also bei einer AFP-positiven Spur mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Herkunft von einem Feten oder Neugeborenen geschlossen werden, wobei lediglich noch die Verursachung durch Patienten mit bestimmten seltenen Krebserkrankungen in Betracht gezogen werden muß.

In einer weiteren, zur gleichen Zeit am Institut für Rechtsmedizin angestellten Untersuchung von WILKENS konnte mit dem oben genannten künstlich erzeugten Spurenmaterial fetales Hämoglobin bis zu drei Monaten nachgewiesen werden.

Somit stehen der spurenkundlichen Analyse in der Rechtsmedizin zwei neue, sichere und leicht ausführbare Untersuchungsmethoden mit der CAF-Technik zur Unterscheidung von Neugeborenen- oder Fetalblut und Erwachsenenblut zur Verfügung.

8. Zusammenfassung

Anlass dieser Arbeit war eine Veröffentlichung von PATZELT, GIESERICK und LIGMITZ, in der die Verwertbarkeit des alpha-Fetoproteins (AFP) in der Spurenkunde anhand experimentell erzeugter und bei verschiedenen Bedingungen gelagerter Blutspuren untersucht wurde. Die Verfasser führten den Nachweis einer AFP-positiven Spur in der Überwanderungsgargelelektrophorese mittels Heteroimmunserums. Der Nachweis gelang ihnen 12 Wochen lang.

Ziel der eigenen Arbeit war die Erprobung der Cellulose-Acetat-Folien-Technik für den spurenkundlichen Nachweis von Neugeborenen- oder Fetalblut mit Hilfe der alpha-fetoprotein-Präzipitation als einem Verfahren mit geringem Arbeits- und Zeitaufwand.

Die Technik erwies sich bei Verwendung einer Elektrophoreseausrüstung der Fa. BIOTECT als sehr gut geeignet. Optimale Versuchsbedingungen wurden festgestellt und eingehend beschrieben.

Ferner wurde die Nachweisdauer des AFP bei Spuren von Neugeborenenblut ermittelt, die auf verschiedenen Spurenträgern getrocknet (Holz, Glas, Filterpapier und Stoff) und bei Zimmertemperatur gelagert worden waren.

Insgesamt wurden von 219 Nabelvenenbluten künstliche Spuren auf den vier Trägermaterialien angelegt und diese 31 Wochen bei Zimmertemperatur gelagert. Aus diesem Zeitabschnitt wurden 342 Proben systematisch aufgearbeitet und untersucht. In allen Fällen zeigten die Spuren von Neugeborenenblut mit Anti-AFP (Behringwerke) eindeutige Präzipitate. Bei den Spuren, die zur Kontrolle aus Erwachsenenblut hergestellt worden waren, fehlte das Präzipitat stets.

Damit kann das AFP zur spurenkundlichen Identifizierung von Blutspuren in der GAF-Elektrophorese mittels Heteroimmunserums herangezogen werden. Eine AFP-positive Spur läßt auf Herkunft von einem Feten oder Neugeborenen schließen, wobei differenzialdiagnostisch lediglich eine Verursachung durch Patienten mit seltenen Krebserkrankungen z.B. primärem Lebercarzinom oder benigner Erkrankung z.B. Ataxia telangiectasia (LEHMANN) in Betracht gezogen werden müßte.

Die Anwendung der Cellulose-Acetat-Folien-Technik zur spurenkundlichen Analyse ist deshalb besonders zu empfehlen, weil sie mit der kurzen Zeitdauer der Elektrophorese, der einfachen Arbeitsweise, sowie der Möglichkeit der jederzeit reproduzierbaren Dokumentation der Stärkegel- oder Agargelelektrophorese weit Überlegen ist.

5. Literaturverzeichnis

ABELECY, G.L.: Alpha-fetoprotein production by normal liver and liver tumors. Prot. Biol. Fluids 18, 203 (1971)

ALPERT, M.E. and SEELEB, R.A.: Alpha-fetoprotein in embryonal hepatoblastoma. J. Pediat. 77, 1058 (1970)

ALPERT, M.E. and ZUCKERMANN, J.: Absence of alpha-fetoprotein antigen or antibody in maternal sera Lancet 2, 465 (1970)

BERGSTRAND, C. and CZAR, B.: Demonstration of a new protein in serum from the human fetus. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 8, 147 (1956)

FOY, H. et.al.: The alpha-fetoprotein test in pregnant women, women on oral contraceptives, newborn babies and pyridoxine-desprived baboons. Lancet 1, 1336 (1970)

VAN FURTH, R. and ADOLFINI, M.: In vitro synthesis of the foetal alpha-globulin in man. Nature 222, 1296 (1969)

GASSNER, M., u. GROB, P.J.: Alpha-Fetoprotein, Hepatom und Teratom, Schweiz. Med. Wschr. 102, 465 (1972)

GESERICK, G., MARTH, H., HACKBARTH, J.: Eine neue stärkegelelektrophoretisch nachweisbare Albuminvariante im Serum von Neugeborenen. Kriminalistik und forensische Wissenschaften, 6, 25 (1971)

GITLIN, D., BOESMANN, M.: Serum alpha-fetoprotein, albumin and globulin in the human conceptus. J.Clin. Invest. 45, 1826 (1966)

GRÜNE, A.: Elektrophorese der Lipoid-Fraktionen des Humanserums auf Membranfolien. Fette, Seifen, Anstrichmittel 11, 910 (1965)

HIRAI, H., NISHI, S., WATABE, H.: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein. Prot. Biol. Fluids 20, 579 (1973)

KOHN, J.: Zur Technik der Cellulose-Acetat-Elektrophorese. Ärzt. Lab. 10, 233 (1964)

KOHN, J.: A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. Clin. Chim. Acta 2, 297 (1957)

LAMERZ, R. et.al.: Serum-alpha-Fetoprotein, Veränderung nach partieller Hepatektomie am Menschen. Klin. Wschr. 53, 129 (1975)

LEHMANN, F.-G. und LEHMANN, D.: Vergleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von α_1 -Fetoprotein im Serum. Z.klin. Chem. Biochem. 11, 339 (1973)

LEHMANN, F.-G., LEHMANN, D., MARTINI, G.A.: Reindarstellung, Kristallisation, biochemische Eigenschaften und klinische Bedeutung von α_1 -Fetoprotein. Clin. Chim. Acta 33, 1097 (1971)

LEHMANN, F.-G.: Die Bedeutung von α_1 -Fetoprotein für die Diagnose von Lebertumoren. Internist, 11, 376 (1970)

LEHMANN, F.-G.: Serologische Tumordiagnostik. Internist 16, 214 (1975)

LINDER, E., SCPPXLM, M.: Localization of alpha-fetoprotein in the human fetus and placenta. Acta path. Microbiol. Scand. 73, 565 (1968)

MÜLLER, G.M., GESERICK, G.: Die Anwendung des alpha-Fetoproteins bei der Diagnose des primären Leberzellcarcinoms. Z.Ges. Inn. Med. 27, 1084 (1972)

NISHI, Sh.: Isolation and characterisation of a human fetal alpha-globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient. Cancer Res. 30, 2507 (1970)

PATZELT, D., GESERICK, G., LIGNITZ, G.: Spurenkundliche Identifizierung von Neugeborenen- bzw. Fetalblut mittels alpha₁-Fetoprotein-Präzipitation. Z. Rechtsmedizin 74, 81 (1974)

SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung. (Lübeck) Schmidt-Römhild (1961)

SONNEBORN, H.H.: Die Bestimmung der erythrocytären Enzym polymorphismen Adenosin desaminase (ADA) Adenylatkinase (AK) und Phosphoglucomutase (PGM) mit der Cellulose-Acetat-Folien-Elektrophorese. Biotest-Mitteilungen Heft 29 (1972)

SONNEBORN, H.H., J. STINDL: Die Anwendung des OAF-Elektrophoresesystems für den Nachweis von Au/SH-Antigen und Antikörper sowie α_1 -Fetoprotein, Biotest-Mitteilungen. Heft 29 (1972)

SONNEBORN, H.H.: Gleichzeitige Auftrennung von AK- und ADA-Isoenzymen auf einer Folie. Human-genetik 15, 37 (1972)

MILKENS, R.: Spurenkundliche Identifizierung von fetalem Hämoglobin mit Hilfe der Cellulose-Acetat-Folien-Elektrophorese. Diss. Marburg, noch unveröffentlicht.

ZELTZER, P.M. et.al.: Gallengangsatresie, Fetoprotein klärt Diagnose. Selecta 42, 3654 (1974)

Herrn Professor Dr. med. J. Copen danke ich für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg und für die Überlassung des Themas, ihre Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft bei den Versuchen und bei der Abfassung der Dissertation.

Fräulein G. Mertens danke ich für freundliche Hinweise und für die Anfertigung der Fotos.

Lebenslauf

Ich wurde am 16. April 1947 in Marburg/Lahn als ältester Sohn des Facharztes für innere Krankheiten, Dr. med. Simeon Stafunsky und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Glass, geboren. Osterh 1954 wurde ich in der Emil-von-Behring-Schule in Marburg eingeschult.

Von Ostern 1959 bis zur Reifeprüfung im Juni 1967 besuchte ich das Landschulheim Steinmühle in Cappel bei Marburg.

Zum Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität Marburg für Naturwissenschaften. Leider blieb mir ein Studienplatz in Marburg für das Fach Medizin versagt, sodaß ich mich nach dem Sommersemester 1968 ex-matrikulierte und mich an der Rijksuniversiteit Utrecht/Niederlande für Tiermedizin von 1968-1970 einschrieb.

Zum Wintersemester 1970/71 konnte ich mich dann an der Philipps-Universität in Marburg für Medizin immatrikulieren. Im Herbst 1971 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Herbst 1973 die ärztliche Vorprüfung.

Nach dem Sommersemester 1976 schloß ich das Studium mit dem Staatsexamen ab.

Keine akademischen Lehrer waren in Nürnberg

die Herren Professoren und Dozenten:

Aron, Bichler, Buchholz, Büding, Diuroth,

Sigler, Exner, Friedrich, Ganz, Geus, Solen-

hofen, Graul, Heberich, Humpelmann, Hardewig,

Hansel, Hering, Hess, Hildebrandt, Hilgermann,

Hert, Huch, Jakob, Karlson, Kluver, Kleinmann,

Korke, Korosky, Linnewelt, Mannheim, Marocke,

Martini, Schmis, Oerion, Il., Petry, Pats, Diecken,

Rodeck, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmitz-Moormann,

Schneider, Siegent, Straub, Thosner, Welcher,

Lehmeyer.

